

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-009852

(43)Date of publication of application : 14.01.2003

(51)Int.Cl.

C12N 5/06  
C12M 3/00  
// (C12N 5/06  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 2001-197182

(71)Applicant : MITSUBISHI HEAVY IND LTD  
YUGE RUI

(22)Date of filing : 28.06.2001

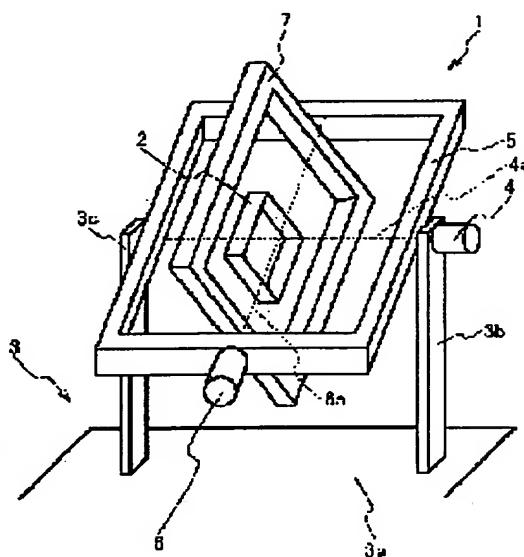
(72)Inventor : UEMURA MASARU  
YUGE RUI

## (54) METHOD FOR MULTIPOTENT STEM CELL, CULTURE SYSTEM FOR MULTIPOTENT STEM CELL AND APPARATUS FOR MULTIPOTENT STEM CELL CULTURE

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for multipotent stem cell culture, with which proliferation and differentiation of multipotent stem cell can be properly controlled.

**SOLUTION:** This method for multipotent stem cell culture comprises a first step for culturing a multipotent stem cell while subjecting the multipotent stem cell to an n-axis rotation (n is an integer of  $\geq 2$ ). Consequently, a multipotent stem cell can be cultured while controlling differentiation. In the operation, preferably the method for multipotent stem cell culture comprises a second step of culturing the multipotent stem cell while applying a force larger than the force of gravity to the multipotent stem cell in a fixed direction relatively to the multipotent stem cell in combination with the first step. Consequently, the multipotent stem cell proliferated in an undifferentiated state as it is can be cultured with promoting differentiation induction in a proper state.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

06.01.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-9852  
(P2003-9852A)

(43) 公開日 平成15年1月14日 (2003.1.14)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
C 1 2 N 5/06		C 1 2 M 3/00	Z 4 B 0 2 9
C 1 2 M 3/00		C 1 2 R 1:91	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
C 1 2 R 1:91)			

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2001-197182(P2001-197182)

(22) 出願日 平成13年6月28日 (2001.6.28)

(71) 出願人 000006208  
三菱重工業株式会社  
東京都千代田区丸の内二丁目5番1号

(71) 出願人 501260163  
弓削 類  
広島県広島市佐伯区来々園6丁目12-23  
303号

(72) 発明者 植村 勝  
兵庫県神戸市兵庫区和田崎町一丁目1番1  
号 三菱重工業株式会社神戸造船所内

(74) 代理人 100102864  
弁理士 工藤 実 (外1名)

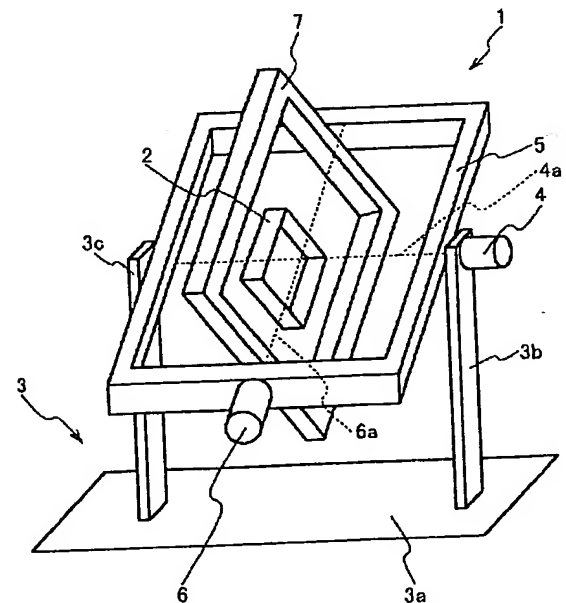
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞の培養方法、多能性幹細胞の培養システム、及び多能性幹細胞培養装置

(57) 【要約】

【課題】 多能性幹細胞の増殖及び分化を適切に制御できる多能性幹細胞の培養方法を提供する。

【解決手段】 本発明による多能性幹細胞の培養方法は、多能性幹細胞を $n$ 軸回転( $n$ は、2以上の整数)しながら、多能性幹細胞を培養する第1ステップを備えている。これにより、分化を抑制しながら、多能性幹細胞が培養可能である。このとき、当該多能性幹細胞の培養方法は、前記第1ステップと組み合わせて、多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力を多能性幹細胞に加えながら、多能性幹細胞を培養する第2ステップを更に備えていることが好ましい。これにより、未分化のまま増殖された多能性幹細胞を、その後、適当な状態までその分化誘導を促進しながら培養することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 多能性幹細胞を $n$ 軸回転( $n$ は2以上の整数)して前記多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞を培養するステップを備えた多能性幹細胞の培養方法。

【請求項2】 (b) 多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力を前記多能性幹細胞に加えて多能性幹細胞の分化誘導を促進しながら前記多能性幹細胞を培養するステップを備えた多能性幹細胞の培養方法。

【請求項3】 請求項2に記載の多能性幹細胞の培養方法において、前記力は、前記多能性幹細胞を一回転軸の回りに回転して前記多能性幹細胞に遠心力を印加することにより発生される多能性幹細胞の培養方法。

【請求項4】 (a) 多能性幹細胞を $n$ 軸回転( $n$ は2以上の整数)して前記多能性幹細胞の分化を抑制しながら前記多能性幹細胞を培養するステップと、

(b) 前記多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力を前記多能性幹細胞に加えて多能性幹細胞の分化誘導を促進しながら前記多能性幹細胞を培養するステップとを備えた多能性幹細胞の培養方法。

【請求項5】 多能性幹細胞を $n$ 軸回転( $n$ は2以上の整数)しながら、前記多能性幹細胞を培養する第1培養装置と、前記多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力を前記多能性幹細胞に加えながら、前記多能性幹細胞を培養する第2培養装置とを備えた多能性幹細胞の培養システム。

【請求項6】 多能性幹細胞と培地とが封入される培養容器と、前記培養容器を、第1回転軸の回りに回転する第1回転装置と、前記培養容器を、前記第1回転軸と平行でない第2回転軸の回りに回転する第2回転装置とを備えた多能性幹細胞培養装置。

【請求項7】 請求項6に記載の多能性幹細胞培養装置において、前記第1回転軸は、重力方向と実質的に平行である多能性幹細胞培養装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、未分化多能性幹細胞の培養方法及び培養装置に関する。本発明は、特に、分化を制御しながら未分化多能性幹細胞を培養する培養方法及び培養装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】現在、再生医学においては、幹細胞移植により目的とする組織及び臓器を修復し、再生する技術

の検討が進められている。多能性幹細胞は、増殖し、世代を繰り返す自己複製能力と共に、多種の成熟細胞に分化する分化能を有している。生体から取り出された多能性幹細胞を培養し、更に分化誘導をかけた上で、再度、生体内に戻すことにより、組織及び臓器を修復し、再生することができると考えられている。

【0003】しかし、現在では、移植された幹細胞の生着率は低い。移植された幹細胞は、生体内に存在することは可能であるが、幹細胞本来の機能を発揮するまでには至っていない。更に、幹細胞は、環境因子によって分化する方向が容易に変化するため、移植された幹細胞が目的の組織及び臓器に分化しない可能性も否定できない。

【0004】幹細胞移植技術を確立するためには、多能性幹細胞を培養する技術の確立が必要である。まず、多能性幹細胞を未分化で培養する技術の確立が必要である。加えて、適切な分化過程にある多能性幹細胞を移植して生着率を高めると共に、事前に適切な分化誘導を多能性幹細胞に対して行う技術の確立が必要である。

【0005】従来、幹細胞の増殖技術、及び分化誘導技術としては、増殖因子及び分化因子となる薬物を含有する培地で幹細胞を培養する技術が知られている。また、他の細胞と混合して幹細胞を培養する技術が知られているが、両者とも実用段階まで技術的には確立していない。更に、容器を多方向から重力を受けるように回転しながら動植物を育成する動植物育成装置が、特許公報(特公平7-89798)に開示されている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、多能性幹細胞の増殖及び分化を適切に制御できる多能性幹細胞の培養方法及び培養装置を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】以下に、【発明の実施の形態】で使用される番号・符号を用いて、課題を解決するための手段が説明される。これらの番号・符号は、【特許請求の範囲】の記載と【発明の実施の形態】の記載との対応関係を明らかにするために付加されている。但し、付加された番号・符号は、【特許請求の範囲】に記載されている発明の技術的範囲の解釈に用いてはならない。

【0008】本発明による多能性幹細胞の培養方法は、(a) 多能性幹細胞を $n$ 軸回転( $n$ は、2以上の整数)しながら、多能性幹細胞を培養するステップを備えている。これにより、分化を抑制しながら、多能性幹細胞が培養可能である。

【0009】このとき、当該多能性幹細胞の培養方法は、更に、(b) 前記(a)ステップの後、前記多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力を多能性幹細胞に加えながら、多能性幹細胞の分化誘導を促進する培養ステップを備えているこ

とが好ましい。これにより、(a)ステップにより未分化のまま培養された多能性幹細胞を、その分化を促進しながら培養することができる。これにより、適切な分化誘導が実現される。

【0010】このとき、多能性幹細胞に印加される力は、多能性幹細胞を一の回転軸の回りに回転し、多能性幹細胞に遠心力を印加することにより発生されることが好ましい。

【0011】また、既述のnは2であることが好ましい。

【0012】本発明による多能性幹細胞の培養システムは、多能性幹細胞をn軸回転(nは、2以上の整数)しながら、多能性幹細胞を培養する第1培養装置(1、21)と、多能性幹細胞に対して一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力を多能性幹細胞に加えながら、多能性幹細胞を培養する第2培養装置(11、21)とを備えている。

【0013】本発明による多能性幹細胞培養装置は、多能性幹細胞と培地とが封入される培養容器(2、22)と、培養容器(2)を、第1回転軸(4a、25a)の回りに回転する第1回転装置(4、25)と、培養容器(2)を第1回転軸(4a、25a)と平行でない第2回転軸(6a、27a)の回りに回転する第2回転装置(6、27)とを備えている。

【0014】このとき、第1回転軸(25a)は、重力方向と実質的に平行であることが好ましい。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、添付図面を参照しながら、本発明による多能性幹細胞の培養方法の実施の一形態を説明する。

【0016】本発明による多能性幹細胞の培養方法の実施の第1形態では、まず、多能性幹細胞が、生体から取り出される。例えば、ラットの多能性幹細胞を取り出す場合、下記方法により多能性幹細胞が取り出される。まず、ラット大腿骨から骨髓細胞が取り出される。取り出された骨髓細胞は、牛胎児血清を含む培地に懸濁される。骨髓細胞が懸濁された培地は、遠心分離法により脂肪成分と細胞沈査とに分離される。得られた細胞沈査は、密度勾配遠心法によって低密度分画と高密度分画とに分離される。その低密度分画から多能性幹細胞がフローサイトメトリにより分離される。

【0017】続いて、取り出された多能性幹細胞が、図1に示されている重力分散型培養装置1により、2軸回転されながら培養される。重力分散型培養装置1は、培養容器2、本体3、モータ4、外側フレーム5、モータ6、及び内側フレーム7を含む。培養容器2には、多能性幹細胞と培地とが封入される。本体3は、基部3aと脚3b、3cを含む。基部3aには、脚3b、3cが接続されている。脚3bには、モータ4が設けられている。モータ4には、外側フレーム5が接続されている。

モータ4は、回転軸4aの回りに外側フレーム5を回転する。外側フレーム5には、モータ6が設けられている。モータ6には、内側フレーム7が接続されている。モータ6は、回転軸6aの回りに内側フレーム7を回転する。回転軸6aは、回転軸4aと概ね直交する。内側フレーム7には、培養容器2が接続されている。培養容器2は、回転軸4aと回転軸6aとの交点の近傍にある。培養容器2は、内側フレーム7と一体に回転する。外側フレーム5と内側フレーム7とがそれぞれ回転されると、培養容器2は、2軸回転することになる。

【0018】多能性幹細胞が2軸回転されながら培養されると、多能性幹細胞にかかる重力は3次的に分散され、多能性幹細胞は、分化が抑えられた状態で増殖する。

【0019】多能性幹細胞が十分に増殖された後、増殖された多能性幹細胞は、図2に示されている過重遠心培養装置11によって培養される。過重遠心培養装置11は、培養容器12、本体13、モータ14、及びロータ15を含む。培養容器12には、重力分散型培養装置1により培養された多能性幹細胞と培地とが封入される。培養容器12に封入される培地は、所望の分化を誘導する各種因子を含む。例えば、骨及び軟骨への分化を誘導する場合、骨及び軟骨への分化を誘導するデキサメタゾン(dexamethasone)及びTGF- $\beta$ が、培地に混入される。本体13には、モータ14が設けられる。モータ14は、ロータ15を回転軸15aの回りに回転する。回転軸15aは、重力方向に実質的に平行である。ロータ15には、培養容器12が固定される。

【0020】ロータ15が回転すると、培養容器12には遠心力が印加され、これにより培養容器12に封入された多能性幹細胞に、多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向であり、且つ、重力よりも大きい力が印加される。ロータ15が回転すると、培養容器12には、重力方向と垂直な水平方向に遠心力F<sub>1</sub>が印加される。培養容器12に封入された多能性幹細胞には、遠心力F<sub>1</sub>と重力F<sub>2</sub>との合力F<sub>3</sub>が作用する。その合力F<sub>3</sub>は、多能性幹細胞に対して一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい。このとき、回転軸15aが重力方向に実質的に平行であることにより、合力F<sub>3</sub>の多能性幹細胞に対する相対方向と、合力F<sub>3</sub>の大きさが、概ね一定に保たれる。これは、分化を促進する上で好ましい。また、培養容器12の細胞培養面は、合力F<sub>3</sub>に対して垂直に設置することが好ましい。

【0021】相対方向が一定であり、且つ、重力よりも大きい力が印加された状態で多能性幹細胞が培養されると、多能性幹細胞の分化が促進される。多能性幹細胞は、所望の状態まで分化され、分化誘導細胞に成長する。分化誘導細胞は、生体細胞移植に使用される。

【0022】実施の第1形態では、多能性幹細胞が2軸回転されながら培養され、多能性幹細胞の分化を抑制し

ながら多能性幹細胞を培養することができる。更に、多能性幹細胞が十分に培養された後、重力よりも大きい力が一定の方向に印加された状態で多能性幹細胞が培養され、多能性幹細胞の分化が促進される。これにより、実施の第1形態では、多能性幹細胞の増殖及び分化が適切に制御可能である。

【0023】なお、本実施の形態では、分化を抑制しながら多能性幹細胞が培養されるとき、その多能性幹細胞は2軸回転されているが、多能性幹細胞が2軸よりも多い回転軸の回りに多軸回転された状態で多能性幹細胞が培養されることも可能である。多軸回転された状態で多能性幹細胞が培養された場合でも、2軸回転の場合と同様に、多能性幹細胞にかかる重力は3次的に分散され、多能性幹細胞は分化が抑えられた状態で増殖する。

【0024】本発明による多能性幹細胞の培養方法の実施の第2形態では、図1の重力分散型培養装置1と、図2の過重遠心培養装置11との代わりに、図3に示された培養装置21が使用される。

【0025】培養装置21は、培養容器22、本体23、支柱24、モータ25、外側フレーム26、モータ27、及び内側フレーム28を含む。培養容器22には、多能性幹細胞と培地とが封入される。本体23には、支柱24が接続される。支柱24は、外側フレーム26を支持する。本体23には、更にモータ25が設けられる。モータ25は、回転軸25aの回りに外側フレーム26を回転する。回転軸25aは、重力方向と平行な方向である。外側フレーム26には、モータ27が接続されている。モータ27は、内側フレーム28を回転軸27aの回りに回転する。内側フレーム28には培養容器22が、同様に接続されている。このような構成を有する培養装置21は、重力分散型培養装置1と過重遠心培養装置11との両方の機能を有する。

【0026】実施の第2形態では、以下のようにして多能性幹細胞が培養される。

【0027】まず、実施の第1形態と同様に、生体から多能性幹細胞が取り出される。取り出された多能性幹細胞は、培地と共に、培養容器22に封入される。

【0028】続いて、培養容器22を2軸回転しながら多能性幹細胞が培養される。即ち、モータ25が外側フレーム26を回転し、且つ、モータ27が内側フレーム28を回転した状態で、培養容器22の中で多能性幹細胞が培養される。モータ25が外側フレーム26を回転し、且つ、モータ27が内側フレーム28を回転すると、培養容器22は2軸回転する。培養容器22が2軸回転されると、多能性幹細胞にかかる重力は3次的に分散され、多能性幹細胞は、分化が抑えられた状態で増殖する。

【0029】多能性幹細胞が十分に増殖された後、培養容器22に封入された培地が、所望の分化を誘導する各種の分化因子を含む培地に交換される。

【0030】続いて、多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい力が多能性幹細胞に印加された状態で、多能性幹細胞が培養される。より詳細には、図4に示されているように、外側フレーム26が、回転軸25aのまわりに回転され、内側フレーム28は、外側フレーム26に対して一定の角度をなすように固定された状態で、多能性幹細胞の培養が行われる。このとき、モータ27は、内側フレーム28を回転しない。これにより、培養容器22は一軸回転され、培養容器22には、遠心力 $F_1$ が印加される。培養容器22に封入された多能性幹細胞には、遠心力 $F_1$ と重力 $F_2$ との合力 $F_3$ が作用する。その合力 $F_3$ は、多能性幹細胞に対して相対的に一定の方向を向き、且つ、重力よりも大きい。

【0031】既述のように、重力よりも大きい力が一定の方向に印加された状態で多能性幹細胞が培養されると、多能性幹細胞の分化が促進される。多能性幹細胞は、所望の状態まで分化され、分化誘導細胞に成長する。分化誘導細胞は、生体細胞移植に使用される。

【0032】実施の第2形態でも、実施の第1形態と同様に、多能性幹細胞の増殖及び分化が適切に制御される。更に実施の第2形態は、実施の第1形態よりも培養に必要な装置が削減されている点で好ましい。

【0033】

【発明の効果】本発明により、多能性幹細胞の増殖及び分化を適切に制御できる多能性幹細胞の培養方法及び培養装置が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明による多能性幹細胞の培養方法の実施の第1形態で使用される重力分散型培養装置1を示す。

【図2】図2は、過重遠心培養装置11を示す。

【図3】図3は、本発明による多能性幹細胞の培養方法の実施の第2形態で使用される培養装置21を示す。

【図4】図4は、培養装置21の動作を示す。

【符号の説明】

- 1：重力分散型培養装置
- 2：培養容器
- 3：本体
- 4：モータ
- 5：外側フレーム
- 6：モーター
- 7：内側フレーム
- 11：過重遠心培養装置
- 12：培養容器
- 13：本体
- 14：モータ
- 15：ロータ
- 21：培養装置
- 22：培養容器

(5)

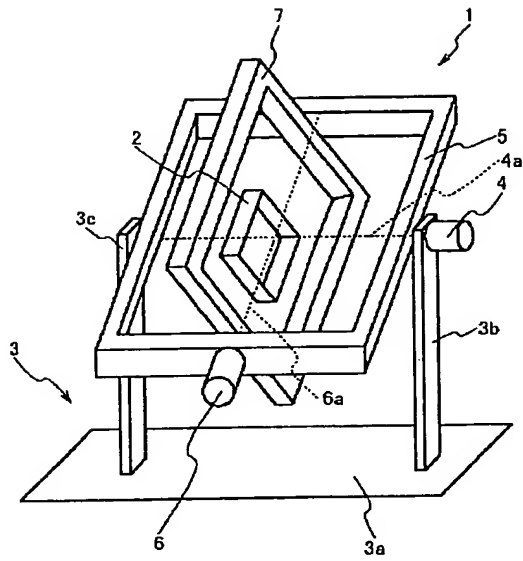
特開2003-9852

8

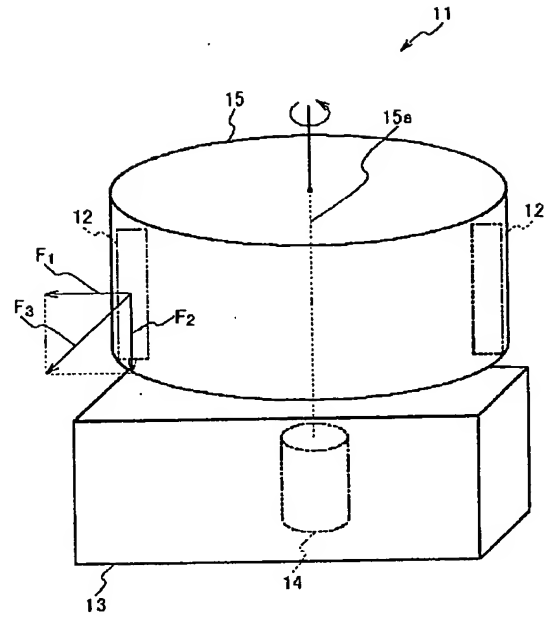
23 : 本体  
24 : 支柱  
25 : モータ

\* 26 : 外側フレーム  
27 : モータ  
\* 28 : 内側フレーム

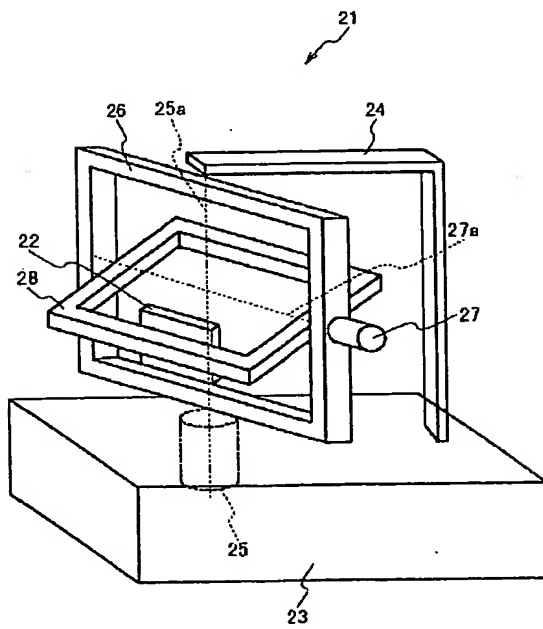
【図1】



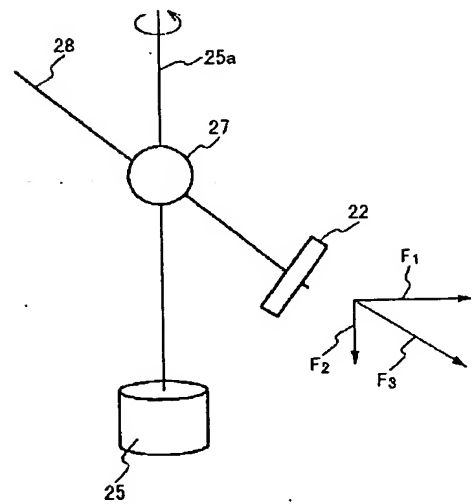
【図2】



【図3】



【図4】



(6)

特開2003-9852

フロントページの続き

(72)発明者 弓削 類  
広島県広島市佐伯区楽々園6丁目12-23  
303号

Fターム(参考) 4B029 AA02 AA11 BB11 CC01 DA01  
DA10 DF10 DG10  
4B065 AA90X BC18